

## Solução nutritiva com adição de N mineral para estudos relacionados à fixação biológica de nitrogênio





*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Agropecuária Oeste  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** 67

## **Solução nutritiva com adição de N mineral para estudos relacionados à fixação biológica de nitrogênio**

Oscar Fontão de Lima Filho  
Luan da Luz Ramos  
Fábio Martins Mercante

*Embrapa Agropecuária Oeste  
Dourados, MS  
2014*



**Embrapa Agropecuária Oeste**

BR 163, km 253,6 - Trecho Dourados-Caarapó

79804-970 Dourados, MS

Caixa Postal 449

Fone: (67) 3416-9700

Fax: (67) 3416-9721

[www.embrapa.br/agropecuaria-oeste](http://www.embrapa.br/agropecuaria-oeste)

[www.embrapa.br/fale-conosco](http://www.embrapa.br/fale-conosco)

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Harley Nonato de Oliveira*

Secretária-Executiva: *Silvia Mara Belloni*

Membros: *Augusto César Pereira Goulart, Auro Akio Otsubo, Clarice Zanoni*

*Fontes, Crêbio José Ávila, Danilton Luiz Flumignan, Fernando Mendes Lamas,*

*Germani Concenço, Ivo de Sá Motta, Marciana Retore e Michely Tomazi*

Supervisão editorial: *Eliete do Nascimento Ferreira*

Revisão de texto: *Eliete do Nascimento Ferreira*

Normalização bibliográfica: *Eli de Lourdes Vasconcelos*

Editoração eletrônica: *Eliete do Nascimento Ferreira*

Foto da capa: *Fábio Martins Mercante*

Arte da capa: *Oscar Fontão de Lima Filho*

**1ª edição**

On-line (2014)

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei N° 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Agropecuária Oeste

---

Lima Filho, Oscar Fontão de

Solução nutritiva com adição de N mineral para estudos relacionados à fixação biológica de nitrogênio / Oscar Fontão de Lima Filho, Luan da Luz Ramos, Fábio Martins Mercante. — Dourados, MS: Embrapa Agropecuária Oeste, 2013.

26 p. ; 21 cm. — (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agropecuária Oeste, ISSN 1679-0456 ; 67).

1. Soja – Nodulação – Solução nutritiva – Nitrato – Amônio.  
2. Fixação biológica de nitrogênio – Soja – Nodulação. I. Ramos, Luan da Luz. II. Mercante, Fábio Martins. III. Embrapa Agropecuária Oeste. III. Título. Série.

---

# Sumário

<b>Resumo</b> .....	5
<b>Abstract</b> .....	7
<b>Introdução</b> .....	8
<b>Material e Métodos</b> .....	10
<b>Resultados e Discussão</b> .....	12
<b>Conclusões</b> .....	22
<b>Referências</b> .....	23



# Solução nutritiva com adição de N mineral para estudos relacionados à fixação biológica de nitrogênio

---

*Oscar Fontão de Lima Filho<sup>1</sup>*

*Luan da Luz Ramos<sup>2</sup>*

*Fábio Martins Mercante<sup>3</sup>*

## Resumo

Com o objetivo de avaliar o efeito da relação nitrato/amônio em substrato sobre a nodulação, parâmetros nutricionais e crescimento da soja, conduziu-se experimento em casa de vegetação, com diferentes concentrações de nitrato e amônio em solução nutritiva. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições e seis tratamentos, sendo cinco tratamentos com a mesma concentração de nitrogênio, porém com diferentes relações dos íons nitrato/amônio, e um tratamento sem nitrogênio (solução de Norris). As sementes utilizadas no experimento foram previamente inoculadas com as estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080, de *Bradyrhizobium japonicum*, semeadas em areia autoclavada e transferidas para as soluções nutritivas com os tratamentos. Foram avaliados parâmetros de crescimento da planta (parte aérea e raízes), nodulação (número e matéria seca de nódulos) e absorção de macro e micronutrientes. Quanto à produção de matéria seca da parte aérea, as plantas supridas com solução nutritiva

---

<sup>(1)</sup>Engenheiro-agrônomo, doutor, pesquisador da Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS. E-mail: oscar.fontao@embrapa.br

<sup>(2)</sup>Engenheiro-agrônomo, mestrando em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. E-mail: luanramos07@hotmail.com

<sup>(3)</sup>Engenheiro-agrônomo, doutor, pesquisador da Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS. E-mail: fabio.mercante@embrapa.br



contendo  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  na proporção de 3:0 e 2:1 foram similares ( $p < 0,01$ ) entre si e superiores aos demais tratamentos. O tratamento com a adição de  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ , na proporção de 3:0, promoveu maiores valores de matéria seca e volume de raízes, número de nódulos e quantidade de N, Ca, S, Cu, Fe e Mn acumulados na parte aérea, bem como N, P, Ca, Mg, S, Fe e Zn acumulados nas raízes de soja. Recomenda-se uma composição de solução nutritiva, com baixo teor de nitrogênio, para estudos envolvendo soja nodulada.

**Termos para indexação:** hidroponia, *Glycine max*, nitrato, amônio.

## Nutrient solution with mineral N addition to studies related to biological nitrogen fixation

---

### Abstract

With the objective of evaluating the effect of the nitrate / ammonium substrate on nodulation, growth and nutritional parameters of soybean experiment was carried out in a greenhouse with different concentrations of nitrate and ammonium in nutrient solution. The experimental design was completely randomized with four replications and six treatments, five treatments with the same nitrogen concentration, but with different ratios of nitrate ions/ ammonium and treatment without nitrogen solution (Norris). The seeds used in the experiment were inoculated with SEMIA SEMIA 5079 and 5080, the *Bradyrhizobium japonicum* sown in autoclaved sand and transferred to nutrient solutions with treatments. We evaluated parameters of plant growth (shoot and roots), nodulation (number and dry weight of nodules) and absorption of macro and micronutrients. As for the dry matter production of shoots, the plants supplied with nutrient solution containing  $\text{NO}_3^-$ :  $\text{NH}_4^+$  in 3:0 and 2:1 ratio were similar ( $p < 0.01$ ) and superior to other treatments was treatment with the addition of  $\text{NO}_3^-$ :  $\text{NH}_4^+$  in the ratio of 3:0 produced greater amounts of dry matter and volume of root nodule number and quantity of N, Ca, S, Cu, Fe and Mn accumulated in the air, as well as N, P, Ca, Mg, Fe and Zn accumulated in soybean roots. It is recommended a composition of nutrient solution with low nitrogen content, for studies involving nodulated soybean.

**Index terms:** hydroponics, *Glycine max*, nitrate, ammonium.

## Introdução

O nutriente exigido em maior quantidade pela cultura de soja (*Glycine max* L.) é o nitrogênio (N), pois os grãos são ricos em proteínas, com teor em torno de 6,5% de N. São quatro as fontes pelas quais a planta pode receber essas doses elevadas de nitrogênio: 1) o solo, geralmente pela decomposição de matéria orgânica; 2) a fixação não biológica, através de descargas elétricas, vulcanismo e combustão; 3) fertilizantes nitrogenados; e 4) o processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico (HUNGRIA et al., 2001).

O N presente no solo é limitado e pode ser rapidamente esgotado depois de alguns cultivos. As condições de temperatura e umidade, reinantes na maior parte do Brasil, também interferem no processo de decomposição da matéria orgânica, causando perdas de N e trazendo, como consequência, solos com baixos teores nesse nutriente (HUNGRIA et al., 2001).

A forma pela qual a assimilação de N pelas plantas ocorre mais rapidamente é pelo uso de fertilizantes nitrogenados, porém esse processo possui um custo muito elevado, já que o processo industrial requer hidrogênio derivado de gás de petróleo, catalisadores que contenham ferro, altas temperaturas (300 °C a 600 °C) e altas pressões (200 atm a 800 atm). Além disso, uma grande parte dos fertilizantes acaba não sendo absorvida pelas plantas, pois é perdida em pouco tempo por processos de lixiviação e transformação em formas gasosas, por meio dos processos de desnitrificação e volatilização (HUNGRIA et al., 2007). No processo de desnitrificação o nitrato é utilizado por bactérias heterotróficas e alguns fungos, como oxidante de matéria orgânica, sendo o nitrogênio removido na forma de gás  $N_2$  (SCHMIDT et al., 2003). Já na volatilização, a amônia presente no solo é liberada para a atmosfera, em um processo que ocorre no máximo em uma semana após a aplicação de N (VAN DIEST, 1988).

Outra fonte de N para a cultura da soja é a fixação biológica do  $N_2$  (FBN), processo que pode ser realizado por inúmeras espécies de bactérias habitantes do solo. O  $N_2$  constitui cerca de 80% dos gases atmosféricos e é difundido também para o espaço poroso do solo; porém, nenhuma planta ou

animal consegue utilizar o nutriente nessa forma química, por causa da tripla ligação existente entre os átomos de N (HUNGRIA et al., 2001).

Após a fotossíntese, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) é considerada o processo biológico mais importante do planeta, sendo essencial para a vida na Terra. O processo é fundamentado na característica de que microrganismos, denominados fixadores de nitrogênio (diazotróficos), quebram a tripla ligação existente entre dois átomos de nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ), transformando-o em amônia ( $NH_3$ ) e posteriormente assimilado pelas plantas (REIS JUNIOR et al., 2011).

Dentre os sistemas fixadores mais conhecidos estão as bactérias denominadas rizóbios, principalmente da ordem *Rhizobiales*. Por meio da simbiose, os rizóbios se associam às plantas da família *Leguminosae*, formando estruturas nas raízes e, eventualmente, no caule, denominadas nódulos. Esses nódulos promovem a ligação da amônia sintetizada com íons  $H^+$ , que são abundantes em sua estrutura, e é transformada em íons de amônio ( $NH_4^+$ ). Há um grande número de espécies leguminosas que estabelecem associação simbiótica com o rizóbio. Esta forma de N é distribuída para a planta hospedeira e incorporada em inúmeros compostos orgânicos nitrogenados, como aminoácidos e ureídeos (HUNGRIA et al., 2007). No processo de FBN, a redução de  $N_2$  para  $NH_3$  é catalisada pela enzima nitrogenase, que, sob condições naturais, reduz  $H^+$  a  $H_2$  gasoso; porém, alguns rizóbios produzem a enzima hidrogenase, que pode romper as moléculas de  $H_2$  formadas e gerar elétrons para a redução de  $N_2$ , aumentando a eficiência da FBN (MARSCHNER, 1995).

Além da FBN por meio de bactérias, o teor de nutrientes disponíveis no substrato interfere diretamente na absorção desses elementos pelo sistema radicular e, conseqüentemente, no crescimento das plantas. O termo eficiência nutricional é utilizado para designar a capacidade da planta de extrair nutrientes do meio de cultivo; o mecanismo utilizado para a absorção difere entre as espécies. Algumas plantas precisam produzir um grande sistema radicular, enquanto outras possuem alta taxa de absorção por unidade de comprimento da raiz, tendo assim um alto influxo de nutrientes (FÖHSE et al., 1988).

A utilização de experimentos com o uso de solução nutritiva é um sistema extremamente útil em estudos de nutrição mineral, na busca de genótipos mais eficientes para determinada cultura. A melhoria na eficiência nutricional aumenta a produtividade e diminui o uso de fertilizantes, com o consequente decréscimo no custo de produção (FAGERIA, 1998). Os íons  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  são as principais formas de N disponível às plantas. A concentração de  $\text{NH}_4^+$  no solo é baixa, pois ocorre uma rápida oxidação para  $\text{NO}_3^-$  (SCHLOERRING et al., 2002). Tanto o  $\text{NO}_3^-$  quanto o  $\text{NH}_4^+$  possuem efeitos diferentes no crescimento e desenvolvimento vegetal, assim como na produção de biomassa (LANE; BASSIRIRAD, 2002). Normalmente, soluções nutritivas específicas para plantas fixadoras de N não utilizam nitrogênio em sua composição. Entretanto, em ecossistemas naturais e agrícolas, os solos possuem quantidades limitadas e variáveis de N, principalmente em compostos orgânicos. Portanto, não há isenção do elemento no ambiente edáfico, não se justificando a sua ausência em condições hidropônicas quando o objetivo é o cultivo e estudo da fixação simbiótica do nitrogênio.

O presente trabalho foi realizado com o intuito de avaliar o efeito de diferentes proporções de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) no substrato, com concentração fixa de 3 mM na nodulação, absorção de nutrientes e crescimento da soja até o florescimento.

## Material e Métodos

### Inoculação de bactérias diazotróficas nas sementes

Foram utilizadas sementes de soja da cultivar BRS 239, inoculadas com uma mistura de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* – SEMIA 5079 e SEMIA 5080. Culturas puras de estirpes das bactérias citadas foram colocadas para crescimento em meio de cultura semi-sólido com extrato de levedura manitol (YMA), por 3 dias, e depois transferidas para meio de cultura líquido, sendo deixadas em agitação por mais 4 dias (VINCENT, 1970). Cada semente de soja recebeu 0,5 ml de meio de cultivo líquido de cada estirpe de bactéria.

## Condução do experimento

O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação na Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, Mato Grosso do Sul, em um delineamento inteiramente casualizado. O ensaio constou de cinco tratamentos, correspondentes a diferentes relações de  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  (1:1, 2:1, 3:0, 1:2 e 0:3) no substrato, com concentração fixa de 3 mM de N, além de um sexto tratamento, sem nitrogênio (NORRIS; T'MANNETJE, 1964), com quatro repetições e duas plantas por vaso, representando uma parcela.

A soja foi semeada em areia autoclavada (120 °C) e 15 dias após a emergência as plântulas foram transferidas para vasos plásticos com capacidade para três litros de solução nutritiva. Os tratamentos foram estabelecidos a partir de modificações da solução de Johnson et al. (1957). Todas as soluções nutritivas foram balanceadas de acordo com a proporção de  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  de cada tratamento. As soluções foram trocadas a cada 15 dias.

A reposição de água destilada foi feita diariamente, além da suplementação semanal de ferro (90  $\mu\text{M}$  por vaso). Na primeira quinzena após o transplante, foi medido diariamente o pH das soluções nutritivas.

## Coleta e análise

Trinta e cinco dias após o transplante, as plantas foram coletadas e avaliados a matéria seca da parte aérea e raízes, o volume das raízes, a nodulação (massa seca e número de nódulos), o teor e a quantidade de macro e micronutrientes.

Na coleta das plantas foram retirados os nódulos e medido o volume das raízes pelo método da proveta graduada (BASSO, 1999). Em seguida, as plantas (parte aérea e raízes) foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 70 °C, para a determinação da massa de material seco, procedendo-se, posteriormente, à moagem e análise química de macro e micronutrientes, segundo metodologia descrita por Malavolta et al. (1997). Todos os dados

foram analisados estatisticamente através da análise de variância e aplicado o teste de Tukey, para a comparação das médias, utilizando-se o sistema computacional Assistat, versão beta 7.6 (SILVA; AZEVEDO, 2009).

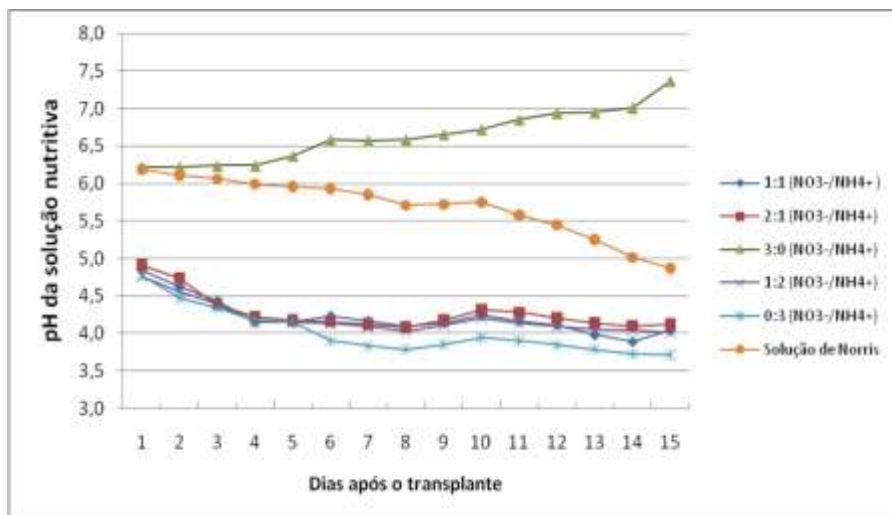
## Resultados e Discussão

### pH das soluções nutritivas

Foram observadas mudanças significativas no pH das soluções nutritivas nos tratamentos (Figura 1). No tratamento que possuía somente  $\text{NO}_3^-$  (3:0) houve aumento de 18% em relação ao valor inicial, chegando a 7,4. Isto pode ser explicado pelo fato de que, quando a planta é exposta a uma concentração proporcionalmente maior de íons  $\text{NO}_3^-$ , as células vegetais possuem tendência de liberar ânions ( $\text{OH}^-$ ) para fora da célula (WILLIAMS; MILLER, 2001). Havendo fonte exclusiva de amônio, a absorção de cátions inorgânicos excede a absorção de ânions inorgânicos, acidificando o ambiente radicular. As hidroxilas geradas nessa situação são neutralizadas pelos íons  $\text{H}^+$  produzidos durante a subsequente assimilação do íon amônio (KIRKBY; MENGEL, 1967). Do mesmo modo, a absorção de cátions em plantas fixadoras de  $\text{N}_2$  excede a absorção de ânions, com efluxo líquido de  $\text{H}^+$  das raízes (ISRAEL; JACKSON, 1982). Assim, o pH da rizosfera aumenta durante a absorção de nitrato, ocorrendo o oposto com o íon amônio. Além disso, a espécie vegetal também influencia o pH da rizosfera (BERGMANN, 1992).

Todos os demais tratamentos sofreram diminuição do pH e, após analisados, puderam ser observados valores, em média, 22% menores que os iniciais. Nesse caso, as células, quanto mais absorvem  $\text{NH}_4^+$ , mais sofrem estímulos para bombear prótons para a parte externa, como um mecanismo para diminuir o potencial de hidrogênio e restaurar a neutralidade elétrica (HEDRICH; SCHROEDER, 1989).

Além disso, deve-se considerar que plantas fixadoras de  $N_2$  têm como fonte principal de nitrogênio a forma molecular (sem carga). A proporção de cátions/ânions absorvida é muito maior em plantas associadas simbioticamente com rizóbios, resultando numa maior excreção líquida de  $H^+$  (MARSCHNER, 1995).



**Figura 1.** pH da solução nutritiva, em função da relação  $NO_3^-:NH_4^+$ , entre o transplante das plântulas de soja e a troca da solução após 15 dias.

## Absorção de nutrientes

A absorção de nitrato e amônio pelas raízes necessita de transportadores específicos para estas formas do N. O nitrato precisa ser convertido a nitrito, pela enzima redutase de nitrato e, em seguida, a amônio, por meio da redutase de nitrito. O amônio é, então, utilizado para formação de aminoácidos. Assim, a absorção das duas formas de N é regulada pela afinidade por carregadores e pela quantidade do elemento no substrato. A assimilação do N requer bastante energia, sendo que para o nitrato a exigência é maior, pois o amônio não precisa ser reduzido para a incorporação em esqueletos carbônicos (BREDEMEIR; MUNDSTOCK, 2000).



## Teor

Na parte aérea, os tratamentos com relação  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  de 1:2 e 0:3 apresentaram similaridade entre si e foram superiores aos demais em teor de N. Os dois tratamentos citados igualaram-se àquele com relação 1:1 em P e K. Já na raiz, todos foram similares em relação a P e S e o tratamento suprido com solução nutritiva sem nitrogênio (solução de Norris) foi superior aos demais em relação ao Mg (Tabela 1).

As plantas que apresentaram menores valores de massa de parte aérea e de raiz tinham igual ou maior concentração na maioria dos nutrientes, com exceção do Ca da parte aérea e raízes. Esse fato é explicado pelo efeito de diluição, ocorrido quando a taxa de absorção do nutriente é relativamente menor que a taxa de crescimento da matéria seca da parte aérea e raízes da planta (FONTES, 2006).

**Tabela 1.** Teor de macronutrientes da parte aérea e raízes de plantas de soja inoculadas com rizóbio e submetidas a diferentes proporções de nitrato e amônio na solução nutritiva.

Relação NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N	P	K	Ca	Mg	S
(g kg <sup>-1</sup> )						
Parte aérea						
1:1	37,5 b	22,0 a	41,5 a	10,9 ab	3,7 ab	2,7 b
2:1	24,3 d	7,6 c	28,2 b	9,4 b	3,5 ab	2,2 b
3:0	29,7 c	6,0 c	28,5 b	15,4 a	3,4 ab	3,1 b
1:2	42,8 a	18,7 a	38,1 a	10,2 ab	3,6 ab	3,2 b
0:3	42,2 a	17,0 ab	39,7 a	8,1 b	3,2 b	4,7 a
Norris	35,0 b	10,0 bc	26,7 b	5,5 b	4,2 a	3,4 b
Raiz						
1:1	25,5 ab	11,9 a	20,2 a	2,9 ab	0,6 b	2,8 a
2:1	20,0 bc	6,9 a	17,3 ab	2,2 b	0,5 b	2,4 a
3:0	24,5 abc	4,9 a	9,8 ab	3,4 a	0,5 b	2,5 a
1:2	28,1 a	6,8 a	8,3 b	1,9 b	0,4 b	3,1 a
0:3	24,7 abc	5,8 a	9,5 ab	2,1 b	0,4 b	2,5 a
Norris	18,4 c	6,4 a	16,3 ab	1,9 b	0,9 a	3,0 a

Nota: letras diferentes indicam contraste pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

O teor de micronutrientes presentes na parte aérea das plantas mostra uma similaridade entre todos os tratamentos nos valores de Cu e B e uma superioridade dos tratamentos com relação  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  de 2:1, 3:0 e 1:2 quando comparado aos demais em teor de Fe (Tabela 2). Na raiz, todos os tratamentos foram similares entre si no teor de Mn e Zn e os tratamentos com relação  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  de 1:1, 1:2, 0:3 e sem utilização de nitrogênio (solução de Norris) foram similares entre si e superiores aos demais em relação ao teor de Cu e Fe.

**Tabela 2.** Teor de micronutrientes da parte aérea e raízes de plantas de soja inoculadas com rizóbio e submetidas a diferentes proporções de nitrato e amônio em solução nutritiva.

Relação $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$	Cu	Fe	Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	Zn	B
<b>Parte aérea</b>					
<b>1:1</b>	5,2 a	269 b	16,0 c	61,0 a	58,2 a
<b>2:1</b>	3,7 a	437 ab	17,2 c	42,5 ab	52,5 a
<b>3:0</b>	4,0 a	544 a	38,5 ab	32,0 ab	49,0 a
<b>1:2</b>	4,2 a	397 ab	21,2 bc	46,7 ab	55,2 a
<b>0:3</b>	4,5 a	301 b	18,5 c	28,0 b	60,0 a
<b>Norris</b>	5,0 a	252 b	54,0 a	46,4 ab	49,0 a
<b>Raiz</b>					
<b>1:1</b>	13,7 a	2.858 a	35,2 a	42,0 a	-
<b>2:1</b>	6,7 b	1.236 c	9,5 a	27,7 a	-
<b>3:0</b>	6,0 b	1.723 bc	8,7 a	22,5 a	-
<b>1:2</b>	15,7 a	2.754 a	23,5 a	40,0 a	-
<b>0:3</b>	10,5 ab	2.570 a	21,7 a	31,7 a	-
<b>Norris</b>	16,0 a	2.138 ab	40,0 a	48,0 a	-

Nota: letras diferentes indicam contraste pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

## Quantidade

A quantidade de N, Ca e S acumulados na parte aérea, assim como N, P, Ca, Mg e S acumulados nas raízes de soja foram superiores no tratamento com relação  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  de 3:0, quando comparado aos demais tratamentos (Tabela 3).

**Tabela 3.** Quantidade de macronutrientes da parte aérea e raízes de plantas de soja inoculadas com rizóbio e submetidas a diferentes proporções de nitrato e amônio em solução nutritiva.

Relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	N	P	K	Ca	Mg	S
Parte aérea						
<b>1:1</b>	141,4 bc	72,5 ab	156,1 bc	34,9 bc	13,8 cd	10,2 bc
<b>2:1</b>	269,1 b	81,0 ab	310,7 ab	104,1 b	38,6 ab	24,9 b
<b>3:0</b>	492,7 a	100,3 a	472,2 a	257,6 a	56,8 a	52,2 a
<b>1:2</b>	89,9 c	40,1 bc	78,6 c	21,0 c	7,4 cd	6,8 c
<b>0:3</b>	30,3 c	11,9 c	28,1 c	5,4 c	2,2 d	3,3 c
<b>Norris</b>	187,9 bc	47,2 bc	138,1 c	27,6 c	21,9 bc	18,9 bc
Raiz						
<b>1:1</b>	16,9 bc	5,7 c	11,0 bc	1,6 c	0,3 c	1,4 cd
<b>2:1</b>	42,3 b	12,8 b	32,5 a	4,4 b	1,0 b	4,7 b
<b>3:0</b>	98,6 a	20,0 a	39,8 a	13,9 a	2,0 a	10,0 a
<b>1:2</b>	14,5 c	3,5 c	4,3 bc	1,0 c	0,2 c	1,6 cd
<b>0:3</b>	7,7 c	1,7 c	2,8 c	0,6 c	0,1 c	0,7 d
<b>Norris</b>	19,5 bc	6,1 c	15,1 b	1,9 c	0,9 b	3,0 bc

Nota: letras diferentes indicam contraste pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Em relação aos micronutrientes, o tratamento com relação  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  de 3:0 proporcionou maior quantidade de Cu, Fe e Mn na parte aérea, assim como Fe e Zn nas raízes das plantas (Tabela 4). Os fatores que fizeram com que o tratamento correspondente à relação  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  de 3:0 se sobressaísse sobre os demais, na maioria dos parâmetros analisados, podem ser explicados pelo fato de que possuíam maior eficiência de utilização, que é a capacidade da planta em extrair nutrientes do meio de cultivo e utilizá-los para seu desenvolvimento (LÄUCHLI, 1987). Essa eficiência está relacionada diretamente com os valores de pH das soluções e com uma possível preferência da soja pela absorção de N em sua forma nítrica ( $\text{NO}_3^-$ ). Entretanto, os estudos a respeito da preferência das plantas pela absorção amoniacal ou nítrica mostram resultados diversos. De modo geral, a absorção amoniacal é preferencial no início do desenvolvimento, mudando para a forma nítrica em estágios de crescimento mais avançados (BLACKMER, 2002).

De acordo com Bloom (1997), as plantas, em geral, tem o amônio como fonte preferencial de N, tendo uma variação espacial e sazonal menor que a do íon nitrato no solo. Por outro lado, em leguminosas, incluindo a soja, o nitrato é mais facilmente translocado para a parte aérea do que o amônio. Para ambos os íons o transporte é mais rápido em leguminosas do que em cereais. A diferença na eficiência de translocação entre espécies pode estar ligada à distribuição e aos teores da redutase de nitrato nas raízes (RAO et al., 1993). Vale et al. (1998) conduziram experimento com feijão e concluíram que a planta estudada tinha maior preferência pela absorção de N na forma de nitrato.

**Tabela 4.** Quantidade de micronutrientes da parte aérea e raízes de plantas de soja inoculadas com rizóbio e submetidas a diferentes proporções de nitrato e amônio na solução nutritiva.

Relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	Cu	Fe	Mn (mg parcela <sup>-1</sup> )	Zn	B
<b>Parte aérea</b>					
<b>1:1</b>	0,017 bc	103,8 c	0,056 c	0,199 b	0,225 b
<b>2:1</b>	0,039 b	508,9 b	0,195 bc	0,442 a	0,578 a
<b>3:0</b>	0,066 a	902,1 a	0,642 a	0,533 a	0,814 a
<b>1:2</b>	0,008 c	82,9 c	0,041 c	0,093 bc	0,117 b
<b>0:3</b>	0,003 c	20,2 c	0,012 c	0,018 c	0,043 b
<b>Norris</b>	0,026 bc	138,1 c	0,264 b	0,222 b	0,260 b
<b>Raiz</b>					
<b>1:1</b>	0,009 b	172,3 bc	0,019 bc	0,025 cd	-
<b>2:1</b>	0,013 ab	242,9 b	0,017 bc	0,053 b	-
<b>3:0</b>	0,024 a	693,9 a	0,035 a	0,090 a	-
<b>1:2</b>	0,008 b	138,8 bc	0,010 c	0,020 d	-
<b>0:3</b>	0,003 b	75,0 c	0,006 c	0,009 d	-
<b>Norris</b>	0,015 ab	206,9 bc	0,032 ab	0,043 bc	-

Nota: letras diferentes indicam contraste pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

A utilização preferencial de uma fonte amoniacal ou nítrica influencia o crescimento da planta, por meio da modificação do pH do meio, afetando a absorção de vários nutrientes, além do N, produção de ácidos orgânicos (maior quando a fonte de N é nítrica), etc. (BERGMANN, 1992). O menor valor de pH dos tratamentos com relação  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  1:1, 2:1, 3:0 e 1:2 interfere diretamente no desenvolvimento da planta, pois a coloca em uma faixa de indisponibilidade de certos elementos essenciais, como cálcio, magnésio, fósforo, nitrogênio, entre outros (HEDRICH; SCHROEDER, 1989). De acordo com BERGMANN (1992), a fertilização com nitrato promove a absorção de íons  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , porém inibe absorção de fosfato.

Os teores obtidos de macro e micronutrientes mostram que houve um efeito de concentração nas plantas, pois os tratamentos com menor quantidade de matéria seca da parte aérea e raízes foram os que apresentaram maiores valores na maioria dos nutrientes analisados (efeito de concentração) e vice-versa, ou seja, plantas com maior desenvolvimento apresentaram teores mais baixos dos nutrientes (efeito de diluição).

Vários fatores podem interferir na relação entre a produção de matéria seca dos diversos órgãos da planta e a concentração de determinado nutriente. Jarrell e Beverly (1981) discutem os efeitos de diluição em estudos nutricionais e apontam alguns mecanismos que podem interferir na acumulação de nutrientes e de matéria seca. No caso desta última, as diferentes relações das formas de nitrogênio em estudo podem ter afetado um ou mais fatores ligados à absorção dos elementos pelas raízes ou à acumulação de matéria seca. Além do pH, a condutividade elétrica (CE), que é proporcional à concentração de íons presentes no meio, pode afetar a absorção de água e de nutrientes. No presente estudo, a média da CE dos tratamentos com relação  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  1:1, 2:1, 3:0, 1:2, 0:3 e solução de Norris foi 1,7; 2,6; 1,7; 1,8; 1,8 e 1,0  $\text{mS cm}^{-1}$ , respectivamente. Apenas os tratamentos com relação  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  igual a 2:1 e Norris foram discrepantes em relação aos demais, porém não havendo relação direta entre a CE e os resultados ligados à produção de massa vegetal, nodulação e absorção de nutrientes.

Outros fatores envolvidos na maior ou menor capacidade de absorção de nutrientes e aumento da massa vegetal incluem crescimento e atividade radicular, velocidade de transporte para a parte aérea, maior demanda pelo elemento, taxa fotossintética, respiração, mobilização de fotoassimilados, balanço hormonal, etc. (JARRELL; BEVERLY, 1981).

## Crescimento, nodulação e eficiência simbiótica

Plantas supridas com solução nutritiva contendo  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  na proporção de 3:0 e 2:1 foram similares estatisticamente ( $p<0,01$ ) entre si e superiores aos demais tratamentos, em relação à produção de matéria seca da parte aérea. O tratamento com a adição de  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  na proporção de 3:0 promoveu maiores valores de massa e volume de raízes, assim como número de nódulos ( $p<0,01$ ). Por outro lado, a massa da matéria seca dos nódulos foi estatisticamente igual nos tratamentos, com relação 3:0, 2:1 e o tratamento controle contendo solução de Norris (Tabela 5).

**Tabela 5.** Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), de raízes (MSR) e de nódulos radiculares (MS nódulos), número de nódulos e volume radicular de plantas de soja submetidas a diferentes proporções de nitrato e amônio em solução nutritiva.

Relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	MSPA	MSR	MS nódulos	Nº de nódulos	Volume da raiz
	(g/parcela)			(unidade/ parcela)	(ml/parcela)
<b>1:1</b>	3,872 b	0,635 c	0,005 b	9,25 b	10,25 c
<b>2:1</b>	11,067 a	2,102 b	0,412 ab	36,75 a	24,00 b
<b>3:0</b>	16,565 a	4,035 a	0,748 a	476,7 b	46,25 a
<b>1:2</b>	2,117 b	0,515 c	0,017 b	8,25 b	5,50 c
<b>0:3</b>	0,720 b	0,295 c	0,008 b	3,75 b	3,25 c
<b>Norris</b>	5,387 b	1,040 c	0,470 ab	139 b	9,00 c

Nota: letras diferentes indicam contraste pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Britto e Kronzucker (2002) explicam que certas culturas sofrem efeito negativo no crescimento quando expostos ao íon  $\text{NH}_4^+$ , pois ocorre uma necessidade de uso dos carboidratos gerados, a fim de permitir uma assimilação rápida do amônio que foi absorvido. Isso ocorre para que seja evitada a acumulação do cátion e que este cause problemas com toxicidade, como a alteração no pH das células e um desbalanço hormonal e iônico.

## Indicação de solução nutritiva para estudos com soja nodulada

Em experimentos hidropônicos, com plantas noduladas, utilizam-se soluções nutritivas sem a presença do nitrogênio, acarretando plantas com baixo crescimento e desenvolvimento. A concentração natural do elemento no solo, sem adubação adicional, permite que sementes inoculadas gerem plantas vigorosas e bem noduladas, considerando outros fatores de produção em nível adequado.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a presença de nitrogênio em baixa concentração equivalente a 3 mM, com relação  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  igual a 3:0, permite um melhor crescimento das plantas de soja, assim como aumento na absorção de macro e micronutrientes, nodulação (massa seca e número de nódulos) e matéria seca e volume da parte aérea e raízes ( $p < 0,01$ ). Assim, recomenda-se a utilização da solução nutritiva contida na Tabela 6, para estudos envolvendo soja inoculada com *B. japonicum* em condições hidropônicas.

**Tabela 6.** Composição de solução nutritiva indicada para estudos em soja nodulada com *Bradyrhizobium japonicum*.

Solução estoque dos nutrientes	Solução estoque por litro de solução nutritiva	Nutriente	Concentração final do nutriente na solução nutritiva	
			(mM)	(ppm)
	(ml)			
KCl (M)	2,5	N	3,0	42
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (M)	1,0	P	1,0	31
KHPO <sub>4</sub> (M)	1,0	K	5,0	195
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O (M)	0,75	Ca	4,0	160
KNO <sub>3</sub> (M)	1,5	Mg	1,0	24
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (M)	3,5	S	1,0	32
Solução de micronutrientes <sup>(1)</sup>	(ml)		(μM)	(ppm)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (25 mM)		B	25	0,27
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O (2,0 mM)		Mn	2,0	0,11
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (2,0 mM)	1,0	Zn	2,0	0,13
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O (0,5 mM)		Cu	0,5	0,03
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> (85% MoO <sub>3</sub> ) (0,5 mM)		Mo	0,5	0,05
Solução de Fe-EDTA (90 mM)		Fe	90	5,0

<sup>(1)</sup>Solução única contendo todos os micronutrientes, com exceção do ferro, o qual é adicionado à parte.

O procedimento a seguir deve ser utilizado para o preparo da solução de Fe-EDTA 90 mM:

- 1) Dissolver 24,9 g de sulfato ferroso heptahidratado em 400 ml de água destilada.
- 2) Dissolver 29,6 g de Na-EDTA em 400 ml de água quente destilada (80 °C) e deixar esfriar.



- 3) Misturar as duas soluções, vertendo-se a solução de Na-EDTA sobre a solução de sulfato de ferro.
- 4) Completar com água destilada para 1 litro de solução (coloração verde-clara).
- 5) Arejar a solução (borbulhando ar ) por 24 horas (coloração marrom-tijolo).
- 6) Utilizar vidro escuro e coberto com papel alumínio, armazenando-o em geladeira.

## Conclusões

A incorporação de 3 mM de nitrogênio, na forma exclusiva de nitrato, em solução nutritiva, propicia o maior crescimento da parte aérea e raízes, massa e número de nódulos, volume de raízes e conteúdo de macro e micronutrientes em soja nodulada.

Considerando os resultados obtidos, recomenda-se uma composição de solução nutritiva para estudos com soja inoculada com *Bradyrhizobium japonicum*.

## Referências

BASSO, S. M. S. **Caracterização morfológica e fixação biológica de nitrogênio de espécies de *Adesmia* DC e *Lotus* L.** 1999. 268 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BERGMANN, W. **Nutritional disorders of plants.** Jena: G. Fischer, 1992. 734 p.

BLACKMER, A. M. Soil fertility and plant nutrition: bioavailability of nitrogen. In: SUMMER, M. E. (Ed.). **Handbook of plant and crop physiology.** 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 385-407.

BLOOM, A. J. Nitrogen as a limiting factor: crop acquisition of ammonium and nitrate. In: JACKSON, L. E. (Ed.). **Ecology in agriculture.** San Diego: Academic Press, 1997. p. 145-172.

BREDEMEIR, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 30, n. 2, p. 365-372, mar./abr. 2000.

BRITTO, D. T.; KRONZUCKER, H. J.  $\text{NH}_4^+$  toxicity in higher plants: a critical review. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 159, n. 6, p. 567-584, 2002.

FAGERIA, N. K. Otimização da eficiência nutricional na produção das culturas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 2, n. 1, p. 6-16, 1998.

FÖHSE, D.; CLAASEEN, N.; JUNGK, A. Phosphorus efficiency of plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 110, n. 1, p. 101-109, Aug. 1988.

FONTES, P. C. R. **Diagnóstico do estado nutricional das plantas**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 122 p.

HEDRICH, R.; SCHROEDER J. I. The physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 40, p. 539-569, 1989.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 48 p. (Embrapa Soja. Circular técnica, 35; Embrapa Cerrados. Circular técnica, 13).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica de nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80 p.

ISRAEL, W. I.; JACKSON, W. A. Ion balance, uptake, and transport process in N<sub>2</sub>-fixing and nitrate- and urea-dependent soybean plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 69, n. 1, p. 171-178, 1982.

JARRELL, W. M.; BEVERLY, R. B. The dilution effect in plant nutrition studies. **Advances in Agronomy**, New York, v. 34, p. 197-224, 1981.

JOHNSON, C. M.; STOUT, P. R.; BROYER, T. C.; CARLTON, A. B. Comparative chlorine requirements of different plant species. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 8, n. 4, p. 337-353, May 1957.

KIRKBY, E. A.; MENGEL, K. Ionic balance in different tissues of the tomato plant in relation to nitrate, urea and ammonium nutrition. **Plant Physiology**, Rockville, v. 42, n. 1, p. 6-14, Jan. 1967.

LANE, D. R.; BASSIRIRAD, H. Differential responses of tallgrass prairie species to nitrogen loading and varying ratios of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> to NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 29, n. 10, p. 1227-1235, 2002.

LÄUCHLI, A. Soil science in the next twenty five years: does a biotechnology play a role? **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 51, n. 6, p. 1405-1409, Nov./Dec. 1987.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas**: princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba: Potafós, 1997. 319 p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1995. 889 p.

NORRIS, D. O.; T'MANNETJE, L. The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp. in relation to their taxonomy and their agronomic use. **East African Agricultural and Forestry Journal**, Nairobi, v. 29, n. 2, p. 214-35, Apr./Jun. 1964.

RAO, T. P.; ITO, O.; MATSUNGA, R. Differences in uptake kinetics of ammonium and nitrate in legumes and cereals. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 154, n. 1, p. 67-72, July 1993.

REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; REIS, V. M.; HUNGRIA, M. Fixação biológica de nitrogênio: uma revolução na agricultura. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. de; REIS JUNIOR, F. B. dos (Ed.). **Biotecnologia**: estado da arte e aplicações na agropecuária. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. p. 247-281.

SCHLOERRING, J. K.; HUSTED, S.; MÄCK, G.; MATTSSON, M. The regulation of ammonium translocation in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 883-890, 2002.

SCHMIDT, I.; SLIEKERS, O.; SCHMID, M.; BOCK, E.; FUERST, J.; KUENE, J. G.; JETTEN, M. S. M.; STROUS, M. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. **FEMS Microbiological Review**, Haren, v. 27, n. 4, p. 481-492, Oct. 2003.

SILVA, F. de A. S. e; AZEVEDO, C. A. V. de. Principal components analysis in the software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE AND NATURAL RESOURCES, 7., 2009, Reno. **Proceedings...** St. Joseph: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

VALE, F. R.; GUAZZELLI, E. M. F.; FURTINI NETO, A. E.; FERNANDES, L. A. Cultivo do feijoeiro em solução nutritiva sob proporções variáveis de amônio e nitrato. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 22, n. 1, p. 35-42, jan./mar. 1998.

VAN DIEST, A. Volatilización del amoníaco en los suelos anegados, y sus repercusiones en el rendimiento de arroz. **Noticiarios de la Comisión Internacional del Arroz**, Rome, v. 37, p. 1-6, 1988.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164 p. (IBP. Handbook, 15).

WILLIAMS, L. E.; MILLER, A. J. Transporters responsible for the uptake partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 659-668, 2001.



---

***Agropecuária Oeste***